

# Lovastatin 생합성 유전자를 이용한 lovastatin 생산균주의 탐색

고희선<sup>1</sup> · 김현수\*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업미생물과

## Screening of lovastatin-producing strains by PCR using lovastatin biosynthesis genes

Hee-Sun Ko<sup>1</sup> and Hyun-Soo Kim\*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

<sup>1</sup>National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-707, Korea.

**Abstract** Lovastatin (also known as Mevinolin, Mevacor, and Monacolin K), an inhibitor of the HMG-CoA reductase produced by *Aspergillus terreus* and other fungi, is used to reduce serum cholesterol levels in human beings. It is derived biosynthetically from two polyketides. One of these is a nonaketide that undergoes cyclization at a hexahydronaphthalene ring system, and the other is a simple diketide, 2-methylbutyrate. Two primer pairs were designed based on the amino acid sequences of lovastatin polyketide synthase and lovastatin diketide synthase for the PCR screening of lovastatin-producing strains. Among the seven selected strains, SJ-2 evidenced the highest level of lovastatin production in both liquid and solid cultures. Soybeans with SJ-2 were treated via 1 hour of heat shock at 30°C for the mass production of lovastatin. The heat-treated soybeans were inoculated on rice bran and the koji extract was obtained after 15 days of incubation. It yielded the highest level of lovastatin production among the strains, and also evidenced 75% inhibition activity against HMG-CoA reductase. We developed an efficient PCR screening method for lovastatin-producing strains, using lovastatin biosynthesis genes.

**Keywords:** *Aspergillus terreus*, HMG-CoA reductase inhibitor, Lovastatin biosynthesis genes

### 서 론

현대 서구 국가뿐만 아니라 선진화된 아시아에서 심장 관상 동맥 질환과 진행성 동맥 경화는 가장 큰 사망 원인 중 하나인데 이를 유발시키는 가장 큰 원인은 고지혈증이다. 고지혈증 (hyperlipidemia)은 혈관 속 지질의 양에 이상이 생긴 상태로서 이로 인해 혈관이 축소되거나 막혀서 심혈관 질환을 일으키는 질병 중 하나이다. 고지혈증 치료제로써 최근 가장 많이 사용되고 있는 것이 statin 계열의 물질로, Statin 계열의 물질은 생체 내에서 콜레스테롤의 합성을 저해하여 결과적으로 콜레스테롤의 양을 저하시킨

다. 콜레스테롤 생합성의 20여개 효소반응 중 desmosterol reductase 보다 앞선 단계인 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase가 관여하는 반응을 저해하는 것으로 알려져 있다(1-3).

HMG-CoA reductase 저해제로는 compactin을 미생물로 수산화반응을 시킨 pravastatin(4), *Aspergillus terreus*가 생산하는 lovastatin과 lovastatin의 화학적 변형으로 개발된 반합성 저해제인 simvastatin(5, 6)이 있다. 그 외의 화학적 합성법에 의해 fluvastatin, atrovastatin, cerivastatin 등이 개발되었다. 이들은 콜레스테롤에 대한 영향은 유사하지만 생물학적 특성과 효능이 다르다(7, 8). 이 중 대표적 콜레스테롤 저해제인 lovastatin (C<sub>24</sub>H<sub>36</sub>O<sub>5</sub>)은 군사 형성 곰팡이인 *Asp. terreus*, *Monascus* sp., *Penicillium* sp. 등에 의해 생산되며, polyketide 경로를 통해서 생합성되는 이 차대사산물로 naphthalene ring system, β-hydroxylactone

### \*Corresponding author

Tel: +82-53-580-5284, Fax: +82-53-580-5509

e-mail: hskim@kmu.ac.kr

및 methylbutyric acid를 포함하고 있는 natural statin이다. Lovastatin을 포함한 대부분의 statin은 lactone과  $\beta$ -hydroxyacid form의 혼합 형태로 생산된다.  $\beta$ -hydroxyacid form은 물에 용해성과 anti-fungal의 특성을 지니고 있으며 lactone ring은 in vivo 상태에서  $\beta$ -hydroxyacid form으로 전환되어 약효를 나타낸다(9, 10).

최근 *Asp. terreus*의 lovastatin 생합성과 관련된 유전자에 대한 연구는 Reeve, McAda 등에 의해 최초로 시도되었고, Kennedy 등의 연구에 의해 18개의 잠재적인 lovastatin 생합성 및 저항성 유전자가 chromosomal DNA의 일부분에 clustering되어 있는 것으로 밝혀졌다(11, 12).

Lovastatin의 생합성 과정은 *Asp. terreus*에 의해  $^{13}\text{C}$ -,  $^2\text{H}$ -,  $^{18}\text{O}$ -labeled 전구체가 lovastatin으로 결합되는 양상을 통해서 알 수 있다. Lovastatin의 주요 부분이 methionine으로부터 유도된 methyl group과 9개의 acetate unit을 갖는 polyketide chain으로 이루어져 있고  $\beta$ -methylbutyryl side chain 또한 methionine에서 유래한 methyl group과 2개의 acetate unit으로부터 만들어진다(13).

Lovastatin 생합성에 중요한 관련효소 중 하나는 *lovB* 유전자 산물인 lovastatin nonaketide synthase (LNKS)로써, 여섯 개의 active site (ketosynthase, acyltransferase, dehydratase, enoylreductase, ketoreductase, acyl carrier protein)를 포함하고 있어, 하나의 효소가 여러 가지 활성을 갖는 domain을 포함하는 type I iterative polyketide synthase (PKS)로 밝혀졌다. 또 다른 필수 효소인 lovastatin diketide synthase (LDKS)는 *lovF* 유전자의 산물로써, 효소의 활성이 반복되지 않는 non-iterative PKS이다. 본 효소는 lovastatin의 side chain인 (2R)-2-methylbutyric acid를 합성하는 것으로 알려져 있다. 상기에서 설명한 효소 이외에도 *lovA*, *lovC*, *lovD*, 그리고 *lovG* 등의 유전자 산물 또한 lovastatin 생합성에 필수적으로 밝혀졌다.

기존의 lovastatin 탐색법으로는 *Neurospora crassa*를 이용한 bioassay법이 널리 알려져 있다(14). 하지만 이는 균주를 탐색하는데 많은 시간과 노동력이 소요되었으며, 본 연구실에서는 lovastatin 생합성 유전자를 이용하여 PCR을 통한 lovastatin 생산균주의 탐색이 신속하고 효과적인 방법으로 사료되었다.

따라서 본 연구에서는 대표적 콜레스테롤 저해제인 lovastatin을 생산하는 *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant의 lovastatin 생합성 유전자 중 polyketide 생합성 유전자 등을 이용한 PCR법으로 *Aspergillus* sp. 이외의 다양한 statin 계열 물질 생산 균주의 분리를 위한 탐색법 구축 및 lovastatin의 생산성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양

곰팡이 분리를 위한 토양시료는 계명대학교 인근 토양 및

나뭇잎을 채취하여 시료 1 g을 증류수 9 ml에 현탁하여  $10^2$ ,  $10^3$ 으로 희석한 후 Czapek-Dox agar배지 (sucrose 30 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, KCl 0.5 g,  $\text{NaNO}_3$  2 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, agar 20 g/L, pH 5.6)에 100  $\mu\text{l}$ 를 도말하여 28°C에서 5~7일간 배양하였다. 도말한 평판배지에서 600 여개의 곰팡이류를 선별하여 PDA 사면배지 (potato starch 4 g, dextrose 20 g, agar 15 g/L, pH 5.6)에 순수 분리하고 4°C에 보관하면서 사용하였다. 공시균인 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주는 lovastatin 생산 배지인 MGP 배지 (malt extract 20 g, glucose 20 g, peptone 3 g, agar 20 g/L)에 접종하여 28°C에서 5일간 배양한 다음 포자현탁액을 조제하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

액체배양은 MGP배지 100 ml에 공시균과 분리균의 포자현탁액을 100  $\mu\text{l}$  ( $1.0 \times 10^8$  spores/ml)씩 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 3, 6, 9, 12일간 배양하였다. 고체배양은 미강 200 g을 고온가압 멸균 처리 후 멸균 증류수 70 ml를 첨가하여 분리균의 포자현탁액 200  $\mu\text{l}$  ( $1.0 \times 10^8$  spores/ml)씩 접종하여 28°C에서 6, 9, 12, 15, 30일간 배양하였다.

대량생산을 위한 전배양은 고온가압멸균 시킨 대두 20개에 분리균 10 ml ( $1.0 \times 10^8$  spores/ml)를 접종하여 28°C에서 48시간 전배양 하였다. 본배양은 미강 200 g을 고온가압 멸균 처리 후 멸균 증류수 70 ml를 첨가하여 전배양한 대두 3개를 접종하여 28°C에서 6, 9, 12, 15, 30일간 배양하였다.

### 선별균주의 형태학적 특성

선별균주의 형태학적 특성은 slide culture를 통하여 확인하였다. Czapek-Dox agar배지를 이용하여 28°C에서 배양하면서 광학현미경으로 관찰하였다.

### 분리균주의 chromosomal DNA 추출

PDA 배지에 배양한 분리균과 MGP 배지에 배양한 공시균을 회수하여 washing buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA·2Na, 0.05 M NaCl, pH 8.0)로 세척한 후 균체 3 g을 -80°C에서 동결시켜 액체 질소를 첨가하면서 파쇄하였다. 파쇄 후 lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA·2Na, 1% SDS, pH 8.0) 10~20 ml를 첨가하여 균체를 용해시킨 다음 동량의 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA·2Na, pH 8.0) 포화 phenol을 첨가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 동량의 sevag 용액 (chloroform : iso-amylalcohol = 24 : 1)을 첨가한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 2배량의 cold 100% ethanol을 넣고 가볍게 흔들어 DNA를 회수하였다. 회수한 DNA를 70% ethanol 2 ml로 세척한 다음 TE buffer 5 ml를 첨가하여 DNA를 용해시켜 RNase A (USB Co.) 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 37°C에서 1시간 처리시킨 후 다시 TE 포화 phenol과 sevag처리를 한 다음 2배량의 cold 100% ethanol로 DNA를 회수하여 70% ethanol,

100% ethanol로 세척한 후 건조하였다. TE buffer 1 ml를 첨가하여 분리한 genomic DNA를 용해시켜 -30°C에 보관하면서 사용하였다.

**Polymerase chain reaction (PCR)**

*Asp. terreus* ATCC 20542의 lovastatin 생합성 유전자 중 중요한 역할을 하는 polyketide synthase 유전자 단백질의 아미노산 배열을 토대로 하여 양 말단에 *BamH* I site와 *EcoR* I site를 포함하는 특이적인 primers 1 (Table 1)과 diketide synthase 유전자 단백질의 아미노산 배열을 토대로 하여 양 말단에 *BamH* I site를 포함하는 특이적인 primers 2(Table 3)를 제작하였다. *Asp. terreus* ATCC 20542의 chromosomal DNA를 templates로 PCR (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, USA)을 수행하였으며 각 PCR 조건은 Table 2, 4와 같다.

**Table 1.** Design of PCR primers 1 for the screening of polyketide synthase genes

	Sequences 5' → 3'
LovP-F	ACGGATCCGCGCAGGAAATCTATCATAC <i>BamH</i> I
LovP-R	ACGAATTCTTCACACTCTGCTAGTCACG <i>EcoR</i> I

**Table 2.** Composition and condition of PCR with primers 1

PCR composition		PCR condition		
Genomic DNA (200 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	94°C	5 min	30 cycles
LovP-F (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	94°C	30 sec	
LovP-R (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	55°C	50 sec	
Go Taq master mix <sup>1)</sup>	5 $\mu$ l	72°C	1 min	
dH <sub>2</sub> O	2 $\mu$ l	4°C	∞	
Total	10 $\mu$ l			

<sup>1)</sup> 'Go Taq Master Mix (Promega Co.)' is a premixed ready-to-use solution containing Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> and reaction buffers.

**Table 3.** Design of PCR primers 2 for the screening of diketide synthase genes

	Sequences 5' → 3'
LovF-F	ATGGGATCCTAYGCNTGGATGCARAARCA <i>BamH</i> I
LovF-R	GTTGGATCCAAYTCCATNACYTTRTGCCA <i>BamH</i> I

**Agarose gel 전기영동 및 lovastatin 생산 균주의 선별**

전기영동 완충용액으로는 TAE buffer (40 mM Tris-acetate,

1 mM EDTA, pH 8.0)를 사용하였으며 2%의 agarose 수평 gel을 사용하여 PCR 산물을 100 V에서 전기영동 하였다. 전기영동 후 260 bp, 500 bp 크기의 목적 PCR 산물이 확인된 균주를 lovastatin 생산균주로 선별하였다.

**Table 4.** Composition and condition of PCR with primers 2

PCR composition		PCR condition		
Genomic DNA (200 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	94°C	5 min	35 cycles
LovF-F (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	94°C	30 sec	
LovF-R (10 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	55°C	1 min	
Go Taq master mix.	5 $\mu$ l	72°C	1 min	
dH <sub>2</sub> O	2 $\mu$ l	72°C	7 min	
Total	10 $\mu$ l	4°C	∞	

**Lovastatin 추출**

액체배양액으로부터 lovastatin의 추출은 배양 일수별로 채취한 배양액 2 ml, CH<sub>3</sub>CN(Merck Co.) 2 ml와 conc. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l를 첨가하여 1시간동안 교반시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 여과하여 제조하였다. 고체배양체로부터 lovastatin의 추출은 배양체 0.5 g와 CH<sub>3</sub>CN 15 ml를 혼합한 후 5분간 sonic 처리를 한 다음 1시간동안 교반시켜 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 4 ml, 멸균수 4 ml와 conc. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100  $\mu$ l를 첨가한 후 여과하여 제조하였다.

**Lovastatin의 HPLC 분석**

생산된 lovastatin은 C<sub>18</sub> reverse phase column을 이용하여 HPLC (Shimadzu Co., Ltd.)로 flow rate 1.0 ml/min, UV 237 nm의 조건에서 20  $\mu$ l씩 injection하여 0.1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>가 포함된 60% CH<sub>3</sub>CN으로 용출시켜 분석하였다.

**Lovastatin의 TLC 분석**

선발된 분리균의 lovastatin 생산은 TLC (Thin layer chromatography)를 통하여 확인하였다. TLC plate (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck Co.)에 lovastatin 표준용액 (acid form 및 lactone form)과 시료 10  $\mu$ l를 spotting하였다. Spotting한 TLC plate는 건조한 후 전개용매 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 8 : 1 : 1)가 들어있는 TLC chamber에서 전개시켰다. 전개 후 TLC plate는 UV (254 nm)로 lovastatin을 확인하였다.

**HMG-CoA reductase에 대한 저해활성 검토**

공시균의 배양추출물은 Lovastatin의 기능인 HMG-CoA reductase에 대한 저해 활성을 측정하기 위하여 Hucher 및

oleson 등의 분광분석 측정법을 변형하여 다음과 같이 수행하였다(15-17). 반응액의 조성은 microsomal protein 1 mg, HMG-CoA 150 nmoles, NADP 2  $\mu$  moles, glucose-6-phosphate 3  $\mu$  moles, glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 unit, 시료 (10 mg/ml) 100  $\mu$ l를 첨가하여 최종 부피가 1 ml되게 하여 37°C에서 30분간 반응하였다. 반응액에 10 mM sodium arsenite solution 20  $\mu$ l를 첨가하고 1분 뒤 3% sodium tungstate를 함유한 2 M citrate buffer (pH 3.5) 0.1 ml를 가하여 37°C에서 10분간 정지하여 반응을 정지하였다. 정지한 반응액의 protein을 제거하기위해 4°C, 15,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 상등액 1 ml를 취하여 2 M Tris buffer (pH 10.6) 0.2 ml와 2 M Tris buffer (pH 8.0) 0.1 ml를 첨가하여 반응액의 pH를 8.0으로 조절하였다. CoA-SH의 생성을 위해 0.4 M sodium arsenite 50  $\mu$ l를 첨가하여 5분간 반응시켰다. 반응액 1 ml를 취하여 3 mM DTNB 20  $\mu$ l를 첨가한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. CoA-SH의 생산량은 아래의 식에 준하여 산출하였다.

$$\text{nmoles/min} = \frac{A (\text{reaction}) - A_0 (\text{control})}{0.0136 \times \text{reaction time}} \times 1.43$$

위 식에서 1.43은 회석배수이며 0.0136은 CoA-SH의 molar extinction coefficient이다. 반응 중에 NADPH를 공급하기 위해 glucose-6-phosphate와 glucose-6-phosphate dehydrogenase를 사용하였고 대조구로는 기질인 NADP를 첨가하지 않았다. HMG-CoA reductase에 대한 저해율은 시료를 넣지 않은 것의 CoA-SH 생산량에 대한 저해의 정도를 백분율로 환산하였다.

## 결과 및 고찰

### Lovastatin polyketide synthase 유전자를 이용한 생산균주 검색

*Asp. terreus* ATCC 20542의 lovastatin 생합성 유전자 중 중요한 역할을 하는 polyketide synthase (PKS) 유전자를 기반으로 하여 260 bp 크기의 *Bam*H I site와 *Eco*R I site를 포함하는 특이적인 primers 1 (LovP-F, LovP-R)을 제작하였다. 분리한 곰팡이로부터 추출한 genome DNA를 대상으로 PCR을 수행한 결과 예상되는 크기인 약 260 bp의 목적 PCR 산물들을 획득하였다(Fig. 1).

PKS 유전자를 대상으로 하여 lovastatin 생산 균주를 검색하였지만 거의 모든 곰팡이가 PKS 유전자를 지니는 것으로 추정되었으며, PCR을 수행한 후 목적 PCR 산물이 명확히 생산된 7균주 (SJ-1, SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-5, SJ-6, SJ-7)를 1차적으로 선발하여 lovastatin diketide synthase 유전자를 이용한 생산 균주 검색에 이용하였다.

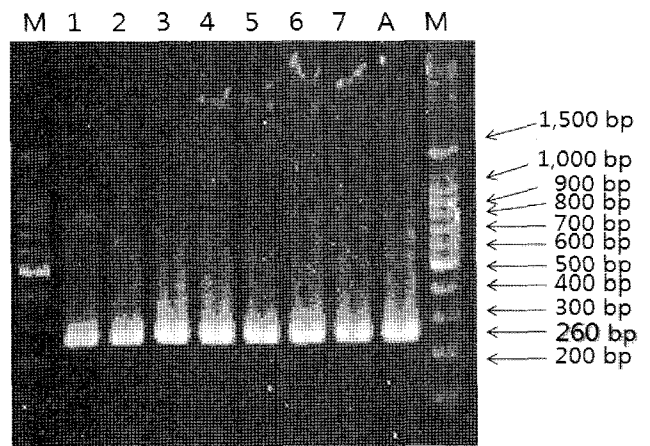


Fig. 1. Gel electrophoresis of amplified PCR products from isolated fungal genomic DNAs by primers 1. M, 100 bp DNA ladder; 1, Strain SJ-1; 2, Strain SJ-2; 3, Strain SJ-3; 4, Strain SJ-4; 5, Strain SJ-5; 6, Strain SJ-6; 7, Strain SJ-7; A, *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant.

### Lovastatin diketide synthase 유전자를 이용한 생산균주 검색

*Asp. terreus* ATCC 20542의 lovastatin 생합성 유전자 중 중요한 역할을 하는 lovastatin diketide synthase 유전자 (LDKS) 단백질의 아미노산 배열을 기반으로 하여 500 bp 크기의 양 말단에 *Bam*H I site를 포함하는 특이적인 primers 2 (LovF-F, LovF-R)를 제작하여 분리한 곰팡이로부터 추출한 genome DNA를 대상으로 PCR을 수행하였다. 그 결과 예상되는 크기인 약 500 bp의 목적 PCR 산물들을 생산하는(Fig. 2) LDKS 유전자를 지니는 6균주 (SJ-1, SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-6, SJ-7)를 lovastatin 생산 균주로 2차 선발하였다.

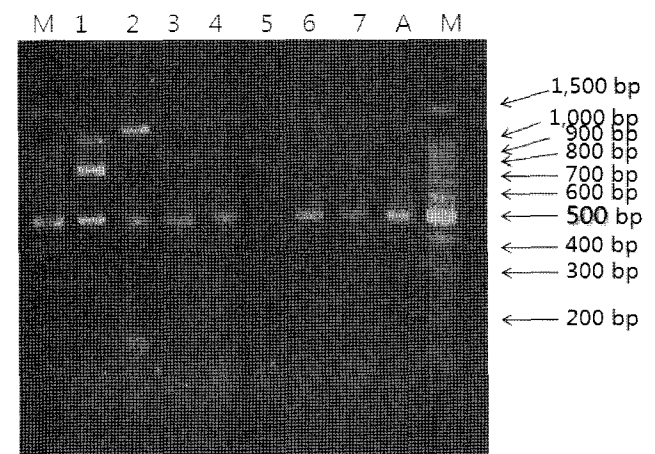


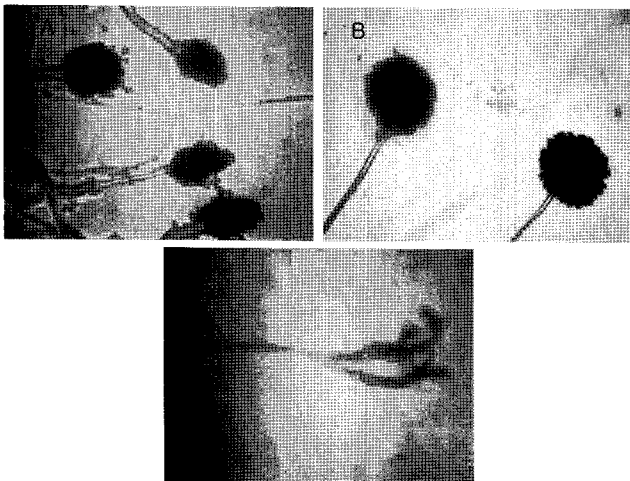
Fig. 2. Gel electrophoresis of amplified PCR products from isolated fungal genomic DNAs by primers 2. M, 100 bp DNA ladder; 1, Strain SJ-1; 2, Strain SJ-2; 3, Strain SJ-3; 4, Strain SJ-4; 5, Strain SJ-5; 6, Strain SJ-6; 7, Strain SJ-7; A, *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant.

**선발균주의 형태학적 특성**

선발된 6개의 균주의 특성을 알아보기 위해 slide culture 를 하여 현미경으로 검경해 본 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 SJ-2, SJ-3, SJ-4, SJ-6, SJ-7는 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주와 유사한 *Aspergillus* sp.으로 추정되었으며, SJ-1은 *Rhizopus* sp., SJ-2는 *Penicillium* sp.으로 추정 하였으며 본 연구의 공시균주로 사용하였다.

**액체배양을 통한 lovastatin의 HPLC 분석**

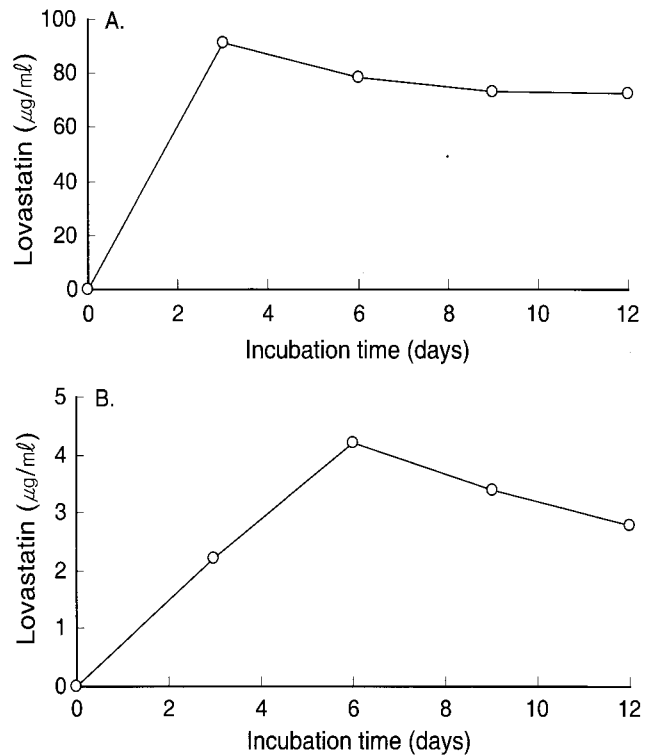
Fig.3의 결과에서 *Aspergillus* sp.과 다른 속으로 추정되는 공시균 SJ-1과 SJ-2는 액체배양을 통하여 lovastatin의 생산능을 검토하였다. 공시균주는 3, 6, 9, 12일간 배양하여 추출한 후 HPLC로서 lovastatin acid form과 lactone form의 생산을 확인하였다. 그 결과 SJ-1은 lovastatin 생산이 미약하였으나 (결과 미계재), SJ-2는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 lovastatin의 acid form과 lactone form의 생산을 확인하였다. 콜레스테롤 생합성 과정의 mevalonate의 합성을 저해하는 lactone form은 배양 6일째에 가장 많이 생산되었다.



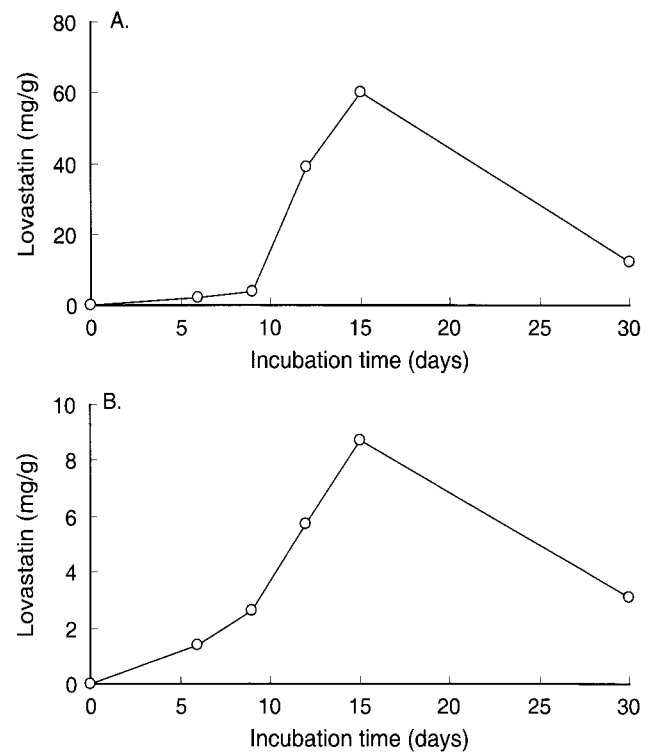
**Fig. 3.** Microscope photos of slide cultures of lovastatin producing strains ( $\times 400$ ). A, *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant; B, Strain SJ-1; C, Strain SJ-2.

**고체배양을 통한 lovastatin의 HPLC 분석**

액체배양을 통하여 lovastatin생산이 확인된 공시균주 SJ-2는 대량생산을 하기 위해 Park 등(18)의 방법에 따라 미강을 이용하여 고체배양을 하였으며 배양추출은 HPLC 로 확인하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 배양 15일째 lovastatin의 생산량이 가장 우수하였으며, lactone form의 생산은 액체배양 시와 비교하였을 때 고체배양이 2배 이상 많은 lovastatin의 생산을 확인하였다(Fig. 4, 5).



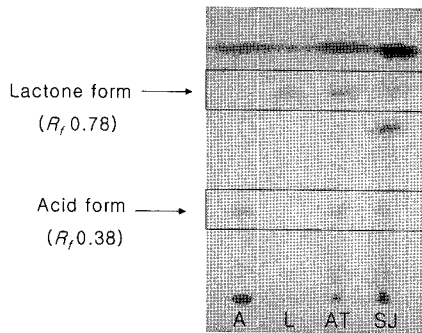
**Fig. 4.** Lovastatin production of SJ-2 in liquid culture. A, Lovastatin acid form production; B, Lovastatin lactone form production.



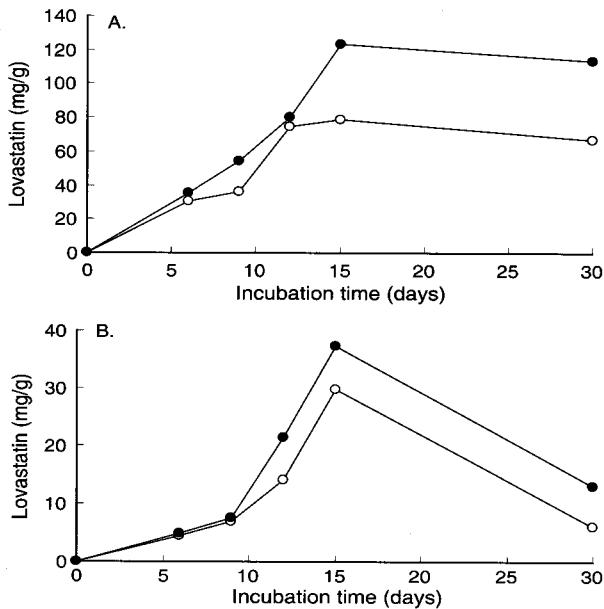
**Fig. 5.** Lovastatin production of SJ-2 in solid culture. A, Lovastatin acid form production; B, Lovastatin lactone form production.

**생산된 lovastatin의 TLC 분석**

선발균주 SJ-2가 생산하는 lovastatin은 공시균인 *Asp. terreus* ATCC 20542와 TLC를 이용하여 비교, 분석하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 lovastatin 표준시료 (acid form 및 lactone form) 및 *Asp. terreus* ATCC 20542가 생산한 lovastatin과 동일하게 acid form은  $R_f$  value 0.38, lactone form은  $R_f$  value 0.78에서 뚜렷한 검출되는 것으로 보아 lovastatin 생산 균주임을 확인하였다.



**Fig. 6.** Detection of lovastatin by TLC analysis. A, Lovastatin acid form (10 µg/ml); L, Lovastatin lactone form (10 µg/ml); AT, *Asp. terreus* ATCC 20542 mutant (100 µg/ml-extract); SJ, SJ-2 (100 µg/ml-extract).



**Fig. 7.** Lovastatin production in solid culture of SJ-2 using soybean for seed culture. A, Lovastatin acid form production; B, Lovastatin lactone form production. symbols : ○, Non-heat treatment; ●, Heat shock at 30°C for 1 hr.

**Lovastatin 생산용 seed culture 대량제조**

선발균주 SJ-2는 lovastatin 생산용 seed culture의 대량

제조를 하기 위해 공시균주인 *Asp. terreus*의 배양조건 (19)인 실험재료 및 방법에 따라 대두를 사용하여 전배양한 후 미강에 본배양하였다. 그 결과 Fig.7에서 보는 바와 같이 포자접종법(Fig. 5)에 의한 전배양보다 대두를 이용한 전배양체를 미강에 배양하였을 때 3.42배 더 많은 lovastatin을 생산하였다.

또한 대두를 이용하여 전배양시 열처리에 따른 포자발아의 촉진에 의한 lovastatin의 생산효과 역시 열처리를 하지 않은 대두보다 30°C에서 1시간동안 열처리를 하였을 때 1.26배 더 많은 lovastatin을 생산하였다. 이들 결과는 곰팡이를 이용한 lovastatin의 대량생산에 대두를 이용한 전배양법 및 열처리에 의한 발아촉진법이 효과적이라는 결과를 재확인하였다.

**HMG-CoA reductase에 대한 저해활성 측정**

공시균인 SJ-2의 배양추출물은 Lovastatin과의 동일한 기능을 확인하기 위하여 HMG-CoA reductase에 대한 저해 활성을 측정하였다. 배양조건을 달리한 배양추출물의 HMG-CoA reductase에 대한 저해능은 Table 5에서 보는 바와 같이 30°C에서 1시간동안 열처리한 배양체가 75%로 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, 이는 lovastatin의 생산량이 가장 많은 결과와 일치하였다.

**Table 5.** Inhibition rate against HMG-CoA reductase activity of SJ-2 extract

Test samples	Specific activity (CoA-SH pmoles/min/mg protein)	Degree of inhibition (%)
Control	353.9	0
Lova-A	294.4	16.8
Lova-L	21	94
Koji extract 1	105	70.3
Koji extract 2	88	75.1

Lova-A, Lovastatin acid form; Lova-L, Lovastatin lactone form; Koji extract 1, Non-heat treatment; Koji extract 2, Heat shock treatment at 30°C for 1 hr.

따라서 본 연구에서와 같이 lovastatin 생산균주의 검색으로 보다 간편한 방법인 lovastatin 생합성 유전자를 이용한 PCR법이 활용될 수 있다고 사료된다.

**요 약**

본 연구는 *Asp. terreus* ATCC 20542 변이주로부터 lovastatin 생합성 유전자 중 polyketide 생합성 유전자 등을 이용한 PCR법으로 *Aspergillus* sp.이외의 statin계열 물질 생산균주의 탐색법 구축 및 lovastatin 대량생산을 하고자 하였다. Lovastatin 생합성 유전자 중 가장 중요한 유전자인 polyketide synthase gene와 diketide synthase gene

로부터 각각의 primer를 제작하여 PCR을 이용한 lovastatin 생산 균주를 탐색하였다. 선발된 7개의 균주의 형태학상의 특성 및 lovastatin 생산성을 검토한 결과 *Aspergillus* sp. 이외의 *Penicillium* sp.으로 추정되는 균주를 재선발하여 SJ-2로 명명하였다. 선발된 SJ-2는 액체배양 및 고체 배양을 한 후 추출하여 TLC와 HPLC를 통하여 각각의 lovastatin 생산량을 비교, 검토하였다. 또한, SJ-2에 대두를 이용하여 lovastatin 고생산성을 확인한 결과, 대두-전 배양체를 30℃, 1시간동안 열처리하여 접종하여 본배양 15일째에 가장 높은 lovastatin을 생산할 수 있었다. In vitro assay 결과에서는 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성도가 75%로 나타났다.

본 연구는 기존의 lovastatin 탐색법으로 널리 알려져 있는 bioassay법이 아닌 lovastatin 생합성 유전자를 이용하여 PCR을 통한 lovastatin 생산균주의 탐색이 신속하고 효과적인 방법으로 사료되었다.

## 감 사

본 연구는 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화연구센터 (TMR)의 일부 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 4월 9일, 게재승인 : 2009년 4월 23일

## REFERENCES

- Demain, A. L. (1999), Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganism, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455-463.
- Stryer, L. (1995), In *Biochemistry*, W. H. Freeman & Company, New York. Vol. 4, pp685-712.
- Tobert J. A. (1988), Efficacy and Long-term adverse effect pattern of lovastatin, *J. American Cardiology.* **62**, 28-34.
- Serizawa, N., Nakagawa, K., Hamano, K., Tsujita, Y., Terahara, A., and Kuwano, H. (1983), Microbial hydroxylation of ML-236B (compactin) and monacolin K (MB-530B), *J. Antibiot.* **36**, 604-607.
- Hoffman, W. F., A. W. Alberts, P. S. Anderson, J. S. Chen, R. L. Smith, and A. K. Willard (1986), 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, 4 side chain ester derivatives of mevinolin, *J. Med. Chem.* **29**, 849-852.
- Endo A. (1992), The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors, *J. Lipid Reseach.* **33**, 1569-1582.
- Slater E. E. and J. S. Macdonald (1988), Mechanism of action and biological profile of HMG-CoA reductase inhibitor, *Drugs.* **36**, 72-82.
- Finkelstein D. B. and C. Ball (1992), *Biotchnology of filamentous fungi*, pp241-251, Butterworth-Heinemann, London, U.K.
- Alberts A. W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Hairris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Alberts-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshchfield, K. Hoogsteen, and J. Springer (1980), Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 3957-3961.
- Hutchinson C. R., J. Kennedy, C. Part, S. Kendrew, K. Auclair, and J. Vedras (2000), Aspect of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases, *Antonie Van Leewenhoek.* **78**, 287-295.
- Kennedy J., K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. S. Vederas, and C. R. Hutchinson (1999), Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis, *Science* **284**, 1368-1372.
- Hutchinson C. R. and I. Fujii (1995), Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics, *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 201-238.
- Greenspan M. D. and J. B. Yudkorvitz (1985), Mevinolin acid biosynthesis by *Aspergillus terreus* and its relationship to fatty acid biosynthesis, *J. Bacteriol.* **162**, 704-707.
- Kumar M. S., P. M. Kimar, H. M. Sarnail, and A. K. Sadhukhan (2000), A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay, *Journal of Microbiological Methods* **40**, 99-104.
- Hucher F. H. and W. H. Oleson (1973), Simplified spectrophotometric method for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by measurement of coenzyme A, *J. Lipid Res.* **14**, 625-631.
- Moon Y. J., K. H. Yeum, and C. K. Sung (2002), Screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor in vitro and its application to pullets, *Korean J. Food and Nutr.* **15**, 307-313.
- Lee J. W., S. M. Lee, K. S. Gwak, J. Y. Lee, and I. G. Choi (2006), Screening of edible mushrooms for the production of lovastatin and its HMG-CoA reductase inhibitory activity, *Kor. J. Microbiol.* **42**, 83-88.
- Park J. H. and H. S. Kim (2004), Production of lovastatin in solid culture, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**, 566-570.
- Kim S. J., H. S. Ko, and H. S. Kim (2008), Development of seed culture using soybean for mass production of lovastatin with *Aspergillus terreus* ATCC 20542 mutant, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 666-670.